

KARAKTERISASI ISOLAT PESTALOTIOPSIS PADA KARET (*Hevea brasiliensis*) MENGGUNAKAN KARAKTER MORFOLOGI DAN MOLEKULER

*Characterization of Pestalotiopsis Isolate on Rubber (*Hevea brasiliensis*) Using
Morphological and Molecular Characteristics*

Tri Rapani FEBBIYANTI¹*, Radite TISTAMA¹, dan Yudianto SARSONO²

¹Pusat Penelitian Karet Sembawa. Jalan Raya Palembang – Pangkalan Balai KM 29
Sembawa, Banyuasin 30953, Sumatra Selatan

²Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian Badan Karantina Pertanian, Kementerian
Pertanian. Jalan Pemuda Nomor 64 Rawamangun Jakarta Timur 13220

*Email: trifebbi@yahoo.com

Diterima : 2 Maret 2021 / Disetujui : 12 Agustus 2021

Abstract

Pestalotiopsis leaf fall disease caused by Pestalotiopsis sp. on rubber plants has been a detrimental disease since 2017 in Indonesian rubber plantations. This disease also attacks all clones and all stages of rubber plants and causes a decrease in latex production. Pathogenic information regarding morphological and molecular characters is needed to know the life cycle and biology of the pathogen. This study aims to detect the Pestalotiopsis species that attack rubber plants in South Sumatra by morphologically and molecularly. Leaf samples infected with leaf fall were taken from the Experimental Garden of the Indonesian Rubber Research Institute, South Sumatra. The research was carried out at the Protection Laboratory of the Indonesian Rubber Research Institute and the Laboratory of Mycology and Plant Quarantine Biomolecular-Center for Diagnostic Standard of Agricultural Quarantine, Agricultural Quarantine Agency Jakarta from April to December 2019. The method in this study was initiated by taking samples from several symptomatic host plants, isolated on PDA media, purified, morphological identification of each isolate, PCR analysis, and sequencing for selected isolate. The results of this study showed that the morphology of Pestalotiopsis was differentiated based on the shape of the conidia, the size of the conidia, the number of

septates, the color of the pigment, and the shape of the basal cells and the middle cells. Pestalotiopsis species obtained based on morphological observations were P. microspora, P. linearis, P. quepinii, P. kunmingensis, P. clavate, and P. cocos. The results of amplification of this rubber leaf fungus obtained 7 isolates that had DNA bands between 525 to 550 basepare (bp), and obtained 2 types of leaf fall fungus from the sequencing results, namely Pseudopestalotiopsis cocos strain CBS 272.29 and Neopestalotiopsis cubana strain CBS 600.96

Keyword: leaf fall diseases; molecular; morphology; Pestalotiopsis; rubber

Abstrak

Penyakit gugur daun Pestalotiopsis yang disebabkan oleh *Pestalotiopsis* sp. pada tanaman karet telah menjadi penyakit yang merugikan sejak tahun 2017 di pertanaman karet Indonesia. Hampir semua klon rekomendasi dan semua stadia tanaman karet terserang penyakit yang mengakibatkan penurunan produksi lateks. Informasi patogen mengenai karakter morfologi dan molekuler diperlukan untuk mengetahui siklus hidup dan biologi

patogen tersebut. Penelitian ini bertujuan mendeteksi spesies *Pestalotiopsis* yang menyerang tanaman karet di wilayah Sumatra Selatan secara morfologi dan molekuler. Sampel daun yang terinfeksi penyakit gugur daun diambil dari Kebun Percobaan Pusat Penelitian Karet, Desa Lalang Sembawa, Kabupaten Banyuasin, Sumatra Selatan. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Proteksi Pusat Penelitian Karet dan Laboratorium Mikologi dan Biomolekuler Karantina Tumbuhan, Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian (BBUSKP), Jakarta pada bulan April hingga Desember 2019. Metode pada penelitian ini diawali pengambilan sampel dari beberapa tanaman inang yang bergejala, kemudian dilakukan isolasi pada media PDA, dimurnikan, kemudian dilakukan identifikasi morfologi pada masing-masing isolat, selanjutnya dilakukan analisa PCR dan hasil PCR yang terpilih dilanjutkan dengan *sequencing*. Hasil penelitian ini menunjukkan morfologi *Pestalotiopsis* dibedakan berdasarkan bentuk konidia, ukuran konidia, jumlah septat, warna pigmen, serta bentuk sel basal dan sel tengah. Spesies *Pestalotiopsis* yang diperoleh berdasarkan pengamatan morfologi yaitu *P. microspore*, *P. linearis*, *P. quepinii*, *P. kunmingensis*, *P. clavate*, dan *P. cocos*. Hasil amplifikasi cendawan daun karet ini diperoleh 7 jenis isolat yang memiliki ukuran pita DNA yang berbeda, dan diperoleh 2 jenis cendawan gugur daun dari hasil *sequencing* yaitu *Pseudopestalotiopsis cocos* strain CBS 272,29 dan *Neopestalotiopsis cubana* strain CBS 600,96.

Kata kunci: karet; molekuler; morfologi; penyakit gugur daun; *Pestalotiopsis*

PENDAHULUAN

Sejak 2017, perkebunan karet di Indonesia khususnya di Sumatra mengalami gugur daun terus menerus sepanjang tahun. Penyakit gugur daun *Pestalotiopsis* yang disebabkan oleh *Pestalotiopsis* sp. pada tanaman karet telah

menjadi penyakit yang merugikan sejak tahun 2017 di pertanaman karet Indonesia. Luas serangan 2018 mencapai 22.000 hektar (Febbiyanti, 2019), dan menjadi 382.000 hektar pada bulan Juni 2019 meliputi wilayah Sumatra Utara, Sumatra Barat, Riau, Jambi, Sumatra Selatan, Bangka Belitung, Bengkulu, Lampung, Jawa Barat, Jawa Tengah, Kalimantan Selatan, Kalimantan Barat, dan Sulawesi Tengah. Penyakit ini juga terjadi di negara produsen karet lainnya yaitu Malaysia, Sri Lanka, India, dan Thailand (Febbiyanti dan Fairuzah, 2019).

Hampir semua klon karet dapat diserang oleh penyakit gugur daun ini. Patogen ini memiliki kisaran inang yang sangat luas yaitu dari jenis palma, mangrove, *Planchonellae*, dan *Podocarpaceae*, serta tersebar di lingkungan agroklimat yang bervariasi (Liu et al., 2010). *Neopestalotiopsis* dan *Pestalotiopsis* juga menyerang jambu biji (Solarte et al., 2018).

Pestalotiopsis menyerang daun dan buah dengan gejala nekrosis berwarna abu-abu atau coklat dikelilingi coklat tua (Keith et al., 2006). Gejala yang mirip juga terjadi pada tanaman karet, gejala penyakit ini berupa bercak kecil yang terus melebar, yang kemudian bercak terus berkembang menjadi nekrosis di bagian sekeliling bercak tersebut. Pada helaian dan tulang daun yang terinfeksi akan mengalami perubahan warna atau bisa juga tidak mengalami perubahan warna sama sekali. Kemudian daun akan gugur secara terus menerus sehingga kanopi tanaman akan menjadi tipis atau mengalami perenggasan (Febbiyanti dan Fairuzah, 2019). Perkembangan serangan *Pestalotiopsis* semakin luas, serangan pada tanaman teh (Maharachchikumbura et al., 2016). *P. pini* merupakan jenis baru yang menyerang tanaman pinus berdasarkan analisis molekuler (Silva et al., 2020). Analisis molekuler dapat membantu secara spesifik menentukan spesies *Pestalotiopsis* (Keith et al., 2006). Penelitian ini bertujuan mendeteksi spesies *Pestalotiopsis* yang menyerang tanaman karet dan tanaman

inang lainnya di wilayah Sumatra Selatan secara morfologi dan molekuler

Kultur spora tunggal digunakan untuk identifikasi morfologi dan analisis molekuler.

METODOLOGI

Tempat dan Waktu

Sampel daun yang terinfeksi oleh penyakit gugur daun (PGD) *Pestalotiopsis* diambil dari Kebun Percobaan Pusat Penelitian Karet, Desa Lalang Sembawa, Kabupaten Banyuasin, Sumatra Selatan. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Proteksi Pusat Penelitian Karet dan Laboratorium Mikologi dan Biomolekuler Karantina Tumbuhan, Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian (BBUSKP), Jakarta pada bulan April hingga Desember 2019.

Alat dan Bahan

Isolat diperoleh dari sampel daun yang terserang oleh PGD dari beberapa klon karet AVROS, IRR 05, BPM 24, IRR 39, IRR 301, PR 255, IRR 112, manggis, dan kelapa sawit. Bahan untuk isolasi menggunakan media *potato dextrose agar* (PDA). Identifikasi jamur secara morfologi menggunakan pewarnaan *lactophenol cotton blue* menggunakan mikroskop cahaya (Shamly et al., 2014). Spesies jamur diidentifikasi secara molekuler menggunakan Primer ITS1/ITS4 dan primer BOT15/16 spesifik untuk identifikasi jenis jamur (Legiastuti dan Aminingsih, 2012).

Isolasi Daun yang Bergejala PGD

Potongan daun yang terinfeksi PGD disterilisasi permukaan menggunakan klorox 5% selama 5 menit dan dibilas dengan air steril, kemudian direndam dengan 70% etanol selama 60 detik. Setelah dibilas dengan air steril, potongan daun dikeringkan di atas tissue steril dan diletakkan di atas media PDA. Setelah 2 minggu jamur dipindahkan ke media baru.

Identifikasi Jamur

1. Pengamatan karakteristik Morfologi dan Koloni Jamur

a. Pengamatan Secara Langsung (*Direct Inspection*)

Sampel daun karet bergejala hawar daun diperoleh dari Pusat Penelitian Karet Sembawa diuji secara langsung (*direct inspection*) di Laboratorium Mikologi Karantina Tumbuhan, Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian, Jakarta. Pengujian ini mencakup karakteristik makro dan mikro jamur target.

Seluruh sampel daun karet bergejala diperiksa secara langsung dengan menggunakan mikroskop stereo untuk melihat ada atau tidaknya hifa, konidia, tubuh buah (*pycnidia*), dan sorus. Semua jamur yang ditemukan dibuat preparat pada objek gelas dengan setetes larutan sere dan ditutup dengan *cover glass*. Preparat tersebut kemudian diidentifikasi secara morfologi dan morfometri dengan menggunakan mikroskop kompon. Hasil identifikasi selanjutnya didokumentasikan dalam bentuk foto.

b. Pengamatan Tidak Langsung dengan Menggunakan Metode Kertas Saring (*Blotter Test*)

Seluruh sampel daun karet bergejala hawar dibilas air biasa yang mengalir, dipotong kecil-kecil, direndam klorox 1% ($\pm 1 - 2$ menit) dan dicuci dengan air akuades steril. Kemudian diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi kertas saring yang telah dilembapkan dengan air akuades steril. Selanjutnya diletakkan dalam ruang inkubasi pada temperatur sejuk selama $\pm 7-14$ hari di bawah penyinaran *Near Ultra Violet* (NUV) 12 jam terang-gelap. Setelah diinkubasi,

seluruh sampel daun karet bergejala hawar dalam cawan petri diperiksa untuk melihat ada atau tidaknya hifa, konidia, tubuh buah (*pycnidia*), dan sorus. Semua jamur yang ditemukan dibuat preparat pada objek gelas dengan setetes larutan siere dan ditutup cover gelas. Preparat tersebut kemudian diidentifikasi secara morfologi dan morfometri dengan menggunakan mikroskop kompon. Hasil identifikasi selanjutnya didokumentasikan dalam bentuk foto.

c. Pengamatan Tidak Langsung dengan Menggunakan Kultur

Seluruh sampel daun karet bergejala hawar dibilas air biasa yang mengalir, direndam klorox 1% (\pm 1-2 menit), dicuci dengan air akuades steril dan dikeringanginkan. Selanjutnya seluruh sampel diperiksa secara langsung menggunakan mikroskop stereo untuk melihat ada atau tidaknya hifa, konidia, tubuh buah (*pycnidia*), dan sorus. Semua jamur yang ditemukan (dalam bentuk hifa, konidia, tubuh buah (*pycnidia*), dan *sorus*) dibiakkan dalam media PDA secara tunggal dan dilakukan dalam keadaan steril. Selanjutnya diletakkan dalam ruang inkubasi pada temperatur sejuk selama \pm 7-14 hari di bawah penyinaran *Near Ultra Violet* (NUV) 12 jam terang-gelap. Hasil kultur diperiksa dan didokumentasikan.

2. Identifikasi Molekuler

a. Ekstraksi DNA

Identifikasi secara molekuler dengan memanfaatkan PCR dilakukan terhadap isolat jamur target yang diperoleh dari daun karet

bergejala *Pestalotiopsis* asal klon AVROS, IRR 05, BPM 24, IRR 39, IRR 301, PR 255, IRR 112, dan sebagai pembanding menggunakan isolat asal manggis dan kelapa sawit. Isolat diperoleh dari biakan kultur murni masing masing klon berumur 10 hari. Kemudian miselium dari setiap isolat yang ditumbuhkan pada temperatur 26°C, selanjutnya dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer berisi 50 ml media kentang dekstroza (24 g/l) dan digoyang pada 60 rpm dalam suhu kamar selama 5 hari. Kemudian miselium disaring menggunakan ketas saring dan dicuci dua kali dengan akuades steril, dibiarkan mengering selanjutnya diambil 250 mg dan digerus dengan mikro mortal dalam tabung kerucut mikro centrifuge 1,5 ml dengan penambahan nitrogen cair. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *Mini Kit Plant DNeasy*® dari Qiagen GMBH (Jerman) dan sesuai protokol dari produsen. Konsentrasi DNA yang dihasilkan diukur menggunakan Nanodrop 2000, kemudian DNA murni diencerkan menggunakan Aquabides (dd H₂O) steril hingga konsentrasi DNA mencapai 1 µg/µl dan siap digunakan untuk reaksi lebih lanjut.

Setelah memperoleh DNA total maka dilakukan pengujian menggunakan PCR dengan primer universal ITS-1 dan ITS-4 sebagai uji awal atau optimasi untuk memperkuat daerah ITS-I dan ITS-II dari DNA ribosom, meliputi gen rRNA 5,8S (White et al., 1990). Dengan mengikuti komposisi pencampuran untuk reaksi PCR seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi pencampuran reaksi PCR
Table 1. PCR reaction mixing composition

| Komponen <i>Componets</i> | Volume <i>Volume</i> |
|--------------------------------------|-------------------------|
| Primer ITS 1 <i>Forward</i> | 1,0 µl |
| Primer ITS 4 <i>Reverse Template</i> | 1,0 µl |
| (DNA) Master mix | 1,0 µl |
| Nuclease Free Water | 12,5 µl |
| Buffer | 9,5 µl |
| Total | 25,0 µl |

Reaksi amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR dilakukan pada volume total 25 ml dengan kondisi PCR sebagai berikut satu siklus 3 menit pada suhu 94°C, dan kemudian dalam satu siklus amplifikasi adalah denaturasi selama 1 menit pada suhu 94°C (denaturasi), 1 menit pada suhu 37°C (annealing), 2 menit pada suhu 72°C (ekstensi). Seluruh produk amplifikasi DNA dilengkapi dengan ekstensi selama 10 menit pada suhu 72°C.

Kemudian hasil PCR dilanjutkan dengan proses elektroforesis. Agarose yang digunakan sebanyak 2% dalam volume 200 ml 1 x buffer TAE dengan menggunakan tegangan listrik 80 volt selama 45 menit. Gel agarose diletakkan pada UV transilluminator, kemudian dilakukan dokumentasi hasil pita/band molekul DNA (GeneRuler 100 bp DNA Ladder dan 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA).

b. Perunutan dan Analisis DNA

Sekuensing dari hasil produk PCR dilakukan oleh pihak ketiga (First Base di Kuala Lumpur, Malaysia). Hasil sekuensing produk PCR berupa urutan basa DNA sampel yang selanjutnya dibaca serta diedit dan diurutkan dengan menggunakan program MEGA versi 7.0 (Tamura et al., 2007). Urutan sekuen fragmen gen yang diperoleh

selanjutnya diupload ke Bank Gen melalui program BLAST pada website www.ncbi.nlm.nih.gov. Visualisasi hubungan pohon filogenik hasil BLAST diolah dengan menggunakan program Clustal W2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Morfologi

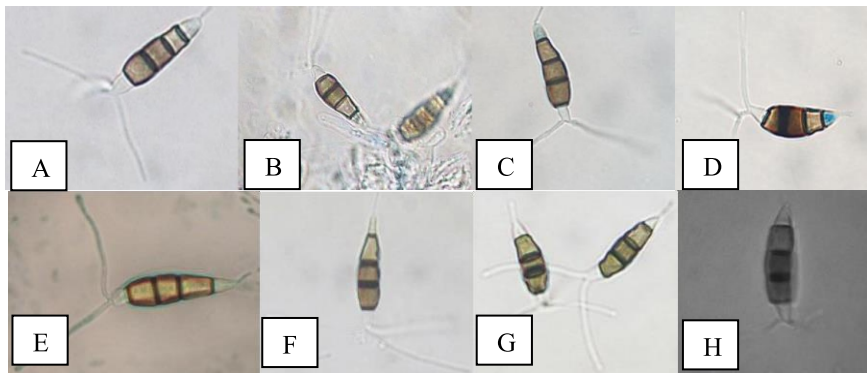
Konidia *Pestalotiopsis* memiliki beberapa tipe morfologi. Secara umum dapat dibedakan bentuk konidia, jumlah, warna septa, ada tidaknya *spathulate tips*. Karakteristik makro berupa tubuh buah (subepidermal piknidia disertai sorus) yang berwarna hitam yang berkembang di sekitar bercak lesi di tengah daun (umumnya ke arah pertulangan daun) berwarna coklat hingga coklat tua, sedangkan karakteristik mikro berupa konidia dan hifa. Konidia *Pestalotiopsis* dicirikan empat septa dan warna pigmen di median sel dengan 2-4 anggota sel muncul pada bagian apical sebagai ekstensi tubular sel apikal dan sebuah anggota bagian basal. Hal ini juga dikemukakan oleh Jeewon et al. (2002) yang menganalisis beberapa *Pestalotiopsis*. Namun demikian karakter morfologi ini dipengaruhi oleh kecepatan pertumbuhan dan struktur konidiospora (Karakaya, 2001). Pertumbuhan koloni *Pestalotiopsis* dipengaruhi oleh suhu ruangan. *Pestalotiopsis* juga bisa tumbuh pada suhu 15°C – 30°C (Keith et al., 2006).

Tabel 2. Identifikasi *Pestalotiopsis* secara morfologi
Table 2. Morphological identification of *Pestalotiopsis*

| Isolat <i>Isolates</i> | Spesies Jamur <i>Fungi Species</i> | Kode <i>Code</i> | Keterangan <i>Note</i> |
|---------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| AVROS | <i>Pestalotiopsis microspore</i> | - | - |
| IRR 301 | <i>Pestalotiopsis linearis</i> | 3 | Belum murni |
| IRR 112 | <i>Pestalotiopsis guepinii</i> | 4 | Belum murni |
| PR 255 | <i>Pestalotiopsis kunmingensis</i> | 10 | Belum murni |
| IRR 39 | <i>Pestalotiopsis clavata</i> | 5 | Belum murni |
| BPM 24 | <i>Pestalotiopsis cocos</i> | 8 | Belum murni |
| Manggis | <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> | - | Belum murni |
| Kelapa sawit | <i>Pestalotiopsis funerea</i> | - | Belum murni |

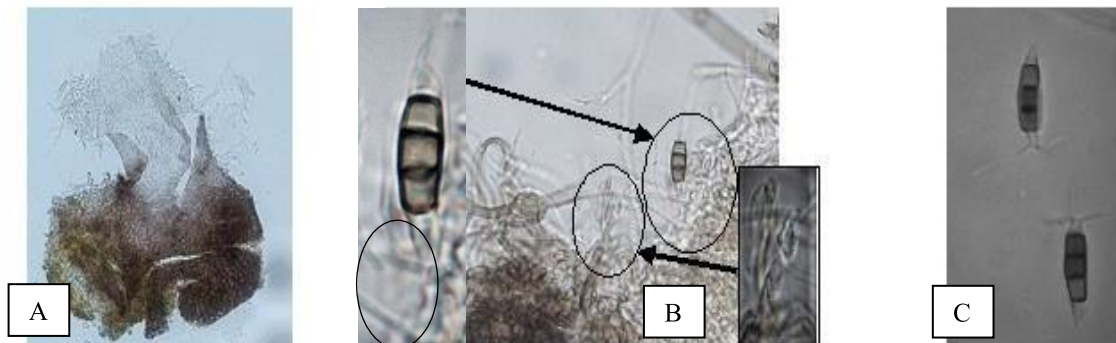
Sepuluh jenis isolat *Pestalotiopsis* asal klon AVROS, PB 260, IRR 301, IRR 112, PR 255, IRR 39, BPM 24, IRR 05, serta inang lain yaitu kelapa sawit dan manggis. Berdasarkan morfologi dan ukuran konidia, jenis jamur dari masing-masing isolat tersaji pada Tabel 2 dan Gambar 2. Enam isolat asal klon karet yang terserang ditemukan 6 spesies *Pestalotiopsis* yang berbeda. Serangan penyakit gugur daun (PGD) *Pestalotiopsis* yang luas dan cepat kemungkinan disebabkan keragaman *Pestalotiopsis* yang cukup luas. Keragaman *Pestalotiopsis* yang luas ini juga

menyebabkan belum ada klon karet yang toleran terhadap PGD ini. Pertanyaannya adalah apakah setiap spesies menyerang spesifik klon. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa hasil isolasi dari daun yang menunjukkan gejala *Pestalotiopsis* diperoleh beberapa spesies jamur *Pestalotiopsis* (Maharachchikumbura et al., 2016; Liu et al., 2017; Solarte et al., 2018). Dengan demikian diduga serangan PGD merupakan kerja sama antara beberapa spesies *Pestalotiopsis* yang melakukan infeksi secara bersamaan atau berurutan atau dengan jamur lainnya.



Gambar 1. Konidia *Pestalotiopsis* sp. (A) *P. microspore*; (B) *Neopestalotiopsis clavispora*; (C) *P. linearis*; (D) *P. guepinii*; (E) *P. kunmingensis*; (F) *P. clavata*; (G) *P. funerea*; (H) *Pseudopestalotiopsis cocos*.

Figure 1. *Pestalotiopsis* sp. conidia. (A) *P. microspore*; (B) *Neopestalotiopsis clavispora*; (C) *P. linearis*; (D) *P. guepinii*; (E) *P. kunmingensis*; (F) *P. clavata*; (G) *P. funerea*; (H) *Pseudopestalotiopsis cocos*.



Gambar 2. Tubuh buah (pycnidia), gobose, semi transparan (A) dan konidia *Pseudopestalotiopsis cocos* (B dan C).

Figure 2. Fruiting bodies (pycnidia), gobose, semi-transparent (A) and conidia of *Pseudopestalotiopsis cocos*

*Karakterisasi Isolat Pestalotiopsis pada Karet (hevea Brasiliensis)
Menggunakan Karakter Morfologi dan Molekuler*

Tabel 3. Karakter morfologi *Pestalotiopsis* dari beberapa klon karet

Table 3. Morphological characterization of *Pestalotiopsis* from several rubber clones

| Jenis | <i>Pestalotiopsis microspora</i> | <i>Pestalotiopsis clavata</i> | <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> | <i>Pestalotiopsis linearis</i> | <i>Pestalotiopsis kunmingensis</i> | <i>Pestalotiopsis guepinii</i> | <i>Pestalotiopsis funerea</i> | <i>Pseudopestalotiopsis cocos</i> |
|-------------------------------------|---|--|--|--|---|--|---|--|
| Konidia | Clavate (gada lonjong sedikit mengembung) | Clavate (gada lonjong sedikit mengembung) | Clavate (gada lonjong sedikit mengembung) | Lurus lonjong (ujung sama besar)/ngembung sedikit melengkung | Lurus, gembung, melengkung | Clavate (berebentuk gada) | Clavate, lonjong menggebung | Lurus, lonjong, ujung sama besar, sedikit gembung, melengkung |
| Luas | ± 20,43-26,29 µm x 5,82 - 8,17 µm | ± 23,85 µm x 7,07 µm | ± 22,26 µm x 7,50 µm | ± 25,71 µm x 6,43 µm | ± 26,07 µm x 7,82 µm | ± 22,49 µm x 5,20 µm | ± 26,07 µm x 6,82 µm | ± 23,8 µm x 6,6 µm |
| Sel Basal | | | | | | | | |
| Jumlah/bentuk | 1 sel-dinding tipis / kerucut tumpul-lebar membulat | 1 sel-dinding tipis / kerucut tumpul-ramping membulat (tanduk) | 1 sel-dinding tipis / kerucut tumpul-ramping membulat (tanduk) | 1 sel-dinding tipis / kerucut tumpul-ramping membulat (tanduk) | 1 sel, berbentuk tabung | 1 sel kerucut tumpul (seperti tanduk) | 1 sel dinding kerucut tumpul (seperti tanduk) | 1 sel dinding tipis/kerucut tumpul ramping membulat bergranula |
| Warna | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin |
| Panjang | ± 5,41 µm | ± 4,88 µm | ± 4,77 µm | ± 4,95 µm | ± 5,92 µm | ± 3,57 µm | ± 5,92 µm | ± 3,5-5 µm |
| Embel-Embel Basal (Pedikel) | | | | | | | | |
| Jumlah/letak | Tunggal (disamping/ ditengah) | Tunggal (ditengah) | Tunggal (ditengah) | Tunggal (ditengah) | 1-2/ ditengah, seringkali cabang | Tunggal (ditengah) | 1-2/ ditengah, seringkali cabang | Tunggal (ditengah) |
| Bentuk | Filiform, tidak cabang | Filiform, tidak cabang | Filiform, tidak cabang | Filiform, tidak cabang | Filiform, bercabang | Filiform, tidak cabang | Filiform, cabang | Filiform, tidak cabang |
| Panjang | ± 5,66 µm | ± 7,14 µm | ± 5,13 µm | ± 5,19 µm | ± 7,10 µm | ± 2,50 µm | ± 7,10 µm. | ± 2,50 µm -7,16 µm |
| Sel tengah | | | | | | | | |
| Jumlah/bentuk | 3 sel, septa ke 3 tebal. lebar-hablur/Gentong (Doliform) | 3 sel, septa ke 2 – 3. tebal/ Gentong (Doliform) | 3 sel, septa ke 3. tebal lebar/ Gentong (Doliform) | 3 sel, septa Tabung (sel ke2 panjang) | 3 sel, septa tebal/ subsilindris-doliform | 3 sel, septa tebal/ Gentong (Doliform) | 3 sel, septa tebal/ subsilindris-doliform | 3 sel, septa tebal/ silindris |
| Warna | Cokelat (degradasi) | Kuning coklat (kuning langsung) | Kuning coklat (kuning langsung) | Coklat, kuning coklat (kuning langsung) | Coklat kuning (sawo matang) | Coklat | Coklat | Coklat |
| Panjang | ± 16,45 µm | ± 15,34 µm | ± 13,99 µm | ± 18,25 µm | ± 14,7 µm | ± 14,58 µm | ± 14,7 µm | 14- 16 x 15,5 µm |
| Sel Apikal | | | | | | | | |
| Jumlah/bentuk | 1 sel/ pendek membulat | 1 sel/ pendek membulat | 1 sel/ pendek membulat | 1 sel/ silendris (seperti tabung) -sub silendris (kerucut) | 1 sel/ silendris (seperti tabung) - sub silendris (kerucut) | 1 sel/ pendek sub silendris (kerucut) | 1 sel/ silendris (seperti tabung) | 1 sel/ silendris (seperti tabung) |
| Warna | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin | Transparan, hialin |
| Panjang | ± 4,43 µm | ± 3,63 µm | ± 5,99 µm | ± 4,95 µm | ± 5,45 µm | ± 4,34 µm | ± 4,34 µm | ± 3,5 - 5 µm |
| Embel-Embel Apikal (Setulae) | | | | | | | | |
| Jumlah | 2-4 (umum 3) | 2-3 (umum 3) | 2-3 (umum 2) | 2-3 (umum 3) | 2-4 (umum 3) | 2-3 (umum 3) | 2-4 (umum 3) | 2-4 (umum 3) |
| Bentuk | Filiform, tidak bercabang | Filiform, tidak bercabang | Filiform, tidak bercabang | Filiform, tidak bercabang | Filiform, tidak bercabang | Filiform, bercabang | Filiform, kadang bercabang, | Filiform, tidak bercabang |
| Panjang | ± 17,82 µm | ± 24,45 µm | ± 23,55 µm | ± 28,37 µm | ± 17-27 µm | ± 23,46 µm | ± 17-27 µm | 5-8 µm |

Karakterisasi Secara Molekuler

Hasil pengujian morfologi dilanjutkan dengan uji PCR menggunakan primer universal ITS1/ITS4. Pengujian dilakukan terhadap enam belas jenis isolat dengan komposisi primer ITS 1 *Forward* dan primer ITS 4 *Reverse*, selanjutnya dilakukan amplifikasi menggunakan PCR dengan volume total 25 µl dalam siklus termal sesuai program ITS1F/ITS4R. Hasil amplifikasi ITS1/ITS4 universal, bagian atas

nampak pita DNA jelas dan tebal garis pada isolat jamur nomor 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, dan 11 serta kode A, B, C, D, E1, E2, E3. Hasil amplifikasi jamur gugur daun diperoleh isolat nomor 2, 3, 4, 5, 7, dan 10 dan C yang layak uji karena memenuhi persyaratan antara lain tebal dan jelas serta memiliki kisaran pita DNA antara 525 hingga 550 basepare (bp) Dalam marker penanda 1 kilobasepare (Kbp). Pita-pita DNA hasil amplifikasi PCR selengkapnya tersaji pada Gambar 3.

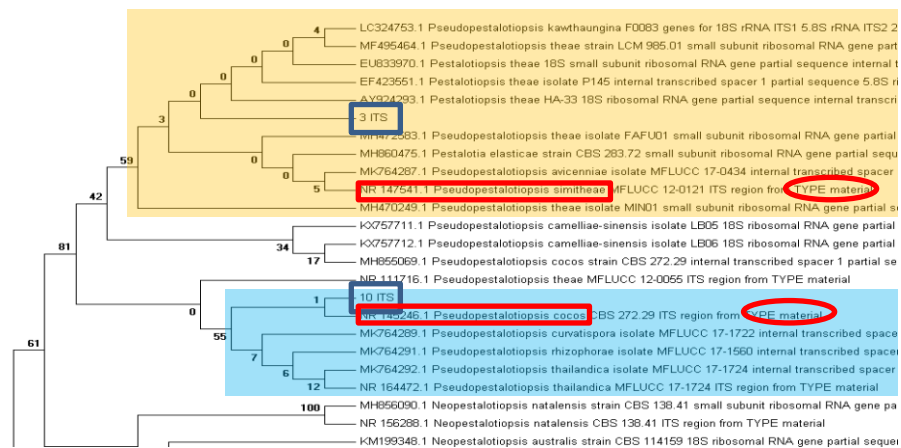


Gambar 3. Hasil amplifikasi menggunakan primer universal ITS1/ITS4 pada gel agarose. Atas: garis 1 berisi marker berukuran 100 bp, garis ke 2 hingga 10 berisi isolat A, B, C, D, E1, E2, E3, Kontrol positif Fox P (K+), Kontrol positif Fox J (K+); Garis ke 12 Kontrol negatif (K-); dan garis ke 13 berisi marker 1kb. Bawah: garis 1 berisi marker 1 kb; garis ke 2 hingga 12 berisi isolat 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11; garis ke 13 berisi kontrol negatif (air steril) (K-).

Figure 3. Amplification product using universal ITS1/ITS4 primers on agarose gel. Above: line 1 contains 100 bp marker, lines 2 to 10 contain isolates A, B, C, D, E1, E2, E3, positive control Fox P (K+), positive control Fox J (K+); 12th line Negative control (K-); and the 13th line contains a 1kb marker. Bottom: line 1 contains 1 kb markers; lines 2 to 12 contain isolates 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11; the 13th line contains a negative control (sterile water) (K-).

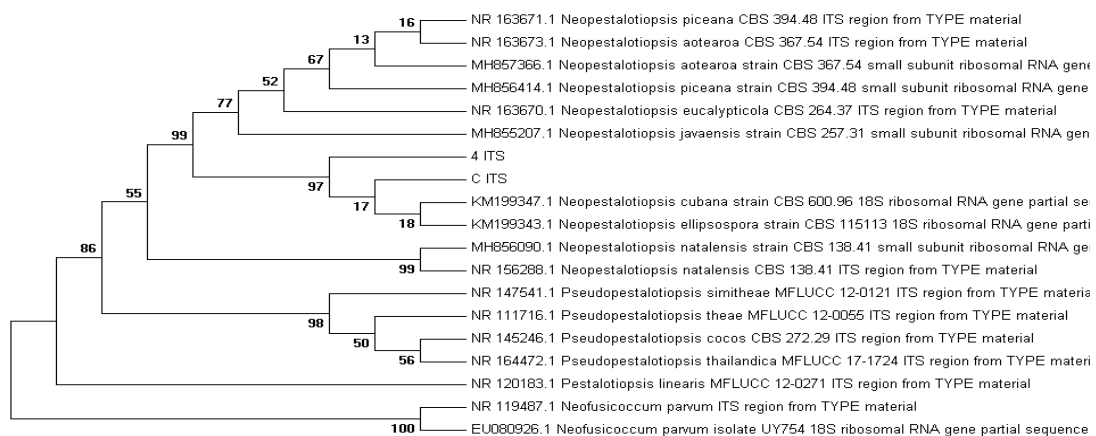
Pestalotiopsis, *Pseudopestalotiopsis*, dan *Neopestalotiopsis* (Gambar 4). Ketiga genus utama tersebut juga telah dilaporkan pada tanaman teh. Liu et al. (2017) melaporkan bahwa bercak daun pada tanaman teh diketahui sebagai kumpulan tiga genus yaitu *Pestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis*, dan *Neopestalotiopsis*.

Ketiga genus tersebut dapat dibedakan dengan mengidentifikasi bentuk konidia, warna, dan ukurannya (Maharachchikumbura et al., 2014). Serangan genus patogen ini juga menyerang tanaman karet dilaporkan oleh Kusdiana et al., 2020).



Gambar 4. Pohon filogenetik isolat nomor 3 yang memiliki kedekatan dengan *Pseudopestalotiopsis theae* dan isolat nomor 10 dengan *Pseudopestalotiopsis cocos* menggunakan analisis *Maximum likelyhood* (© BBUSKP 2019)

Figure 4. The phylogenetic tree of isolates number 3 has closeness to *Pseudopestalotiopsis theae* and isolate number 10 to *Pseudopestalotiopsis cocos* using *Maximum likelyhood* analysis (© BBUSKP 2019)

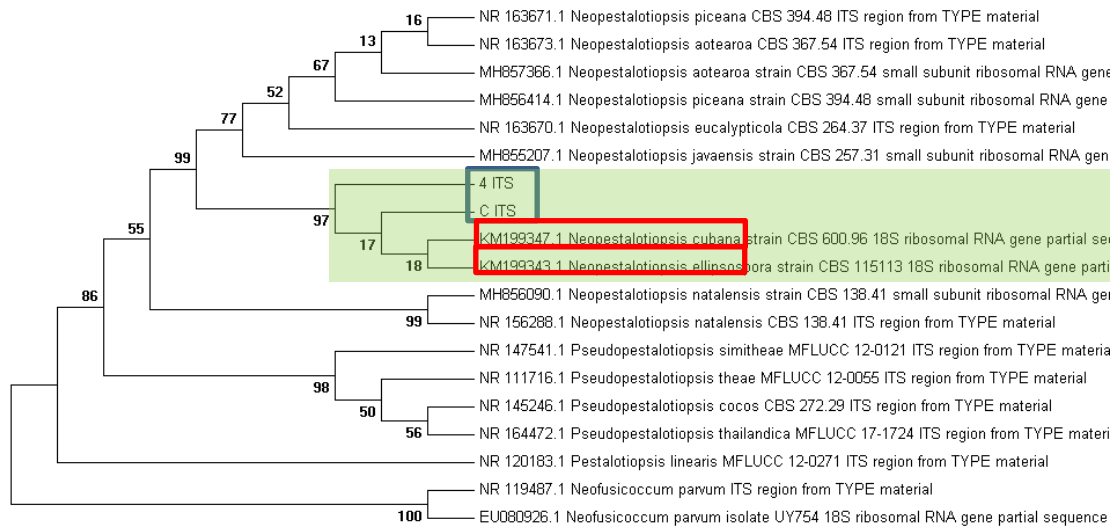


Gambar 5. Pohon filogenetik isolat nomor 4 dan C menggunakan analisa *Nighbor-Joining* (© BBUSKP 2019)

Figure 5. Phylogenetic tree of isolates number 4 and C using *Nighbor-Joining* analysis (© BBUSKP 2019)

Isolat nomer 3 dan 10 berdasarkan urutan sekuennya termasuk ke dalam spesies yang berbeda yaitu isolat 3 masuk ke dalam kelompok spesies *Pseudopestalotiopsis theae* dan *Pestalotiopsis theae*, atau *Pestalotiopsis simitheae*. Sedangkan isolat nomer 10 termasuk dalam kelompok spesies *Pseudopestalotiopsis cocos*. Selain itu isolat nomer 3 juga dekat kekerabatannya dengan *P. simitheae*, *Pseudopestalotiopsis avicennniae*, dan *P. elasticae*. Sementara

Pseudopestalotiopsis cocos lebih spesifik terpisah dari kelompok spesies lain, meskipun demikian isolat nomer 10 juga masih satu kelompok dengan *P. curvatispora*, *P. rhizophorae*, dan *P. thailandica*. *P. theae* dilaporkan menjadi penyebab penyakit bercak daun pada kelapa sawit (Suwannarach et al., 2013). Spesies ini dapat sebagai endofitik atau saprofitik dan semicolous dan diketahui dapat menginfeksi biji *Diospyros crassiflora* (Meli dan Langer, 2009).



Gambar 9. Filogenetik isolat nomor 4 dan C (*Neopestalotiopsis cubana*) menggunakan analisa *Maximum likelihood* (© BBUSKP 2019)

Figure 9. Phylogenetics of isolates number 4 and C (*Neopestalotiopsis cubana*) using maximum likelihood analysis (© BBUSKP 2019)

Tabel 4. Hasil Blast dari tiga jenis jamur
Table 4. Blast result from 3 type of fungi

| Isolat Isolate | Nama di Gen Bank (NCBI) Name in Gen Bank (NCBI) | Tingkat kekerabatan Homology (%) |
|-------------------|---|-------------------------------------|
| 3 ITS | <i>Pseudopestalotiopsis cocos</i> strain CBS 272,29 | 99,62 |
| 4 ITS | <i>Neopestalotiopsis cubana</i> strain CBS 600,96 | 99,26 |
| 10 ITS | <i>Pseudopestalotiopsis cocos</i> strain CBS 272,29 | 99,62 |
| C ITS | <i>Neopestalotiopsis cubana</i> strain CBS 600,96 | 99,63 |

Isolat 4 dan C termasuk spesies *Neopestalotiopsis cubana* berkelompok terdekat dengan *Neopestalotiopsis ellipsospora*. Secara genetik genus ini berbeda jauh secara genetik dibandingkan *Pestalotiopsis* maupun *Pseudopestalotiopsis*

(Solarte et al., 2018). Beberapa laporan menyebutkan bahwa jamur ini umum ditemukan bersama pada daun yang menunjukkan serangan *Pestalotiopsis* (Maharachchikumbura et al., 2016; Solarte et al., 2018; Norphanphoun et al., 2019).

Gejala serangan *Pestalotiopsis* pada tanaman karet mulai nampak jelas pada daun tua. Uji infeksi buatan dengan isolat murni *Pestalotiopsis* lebih efektif apabila daun terlebih dahulu dilukai. Kemungkinan infeksi kelompok jamur ini membutuhkan bantuan jamur lain untuk membantu menginfeksi jaringan daun. Seperti diketahui bahwa pada awal pembentukan daun karet, beberapa penyakit daun seperti *Oidium* dan *Colletotrichum* banyak menginfeksi daun dan menimbulkan bercak atau lisis dinding sel. Kimaru et al. (2018) melaporkan bahwa serangan bercak daun pada tanaman alpukat diketahui disebabkan oleh *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. boninense*, dan *Pestalotiopsis microspore*. *C. acutatum* ditemukan pada bercak daun karet bersama *Pestalotiopsis*.

KESIMPULAN

Morfologi *Pestalotiopsis* dibedakan berdasarkan bentuk konidia, ukuran konidia, jumlah septat, warna pigmen, bentuk sel basal, dan sel tengah. Hasil pengamatan morfologi diperoleh 6 spesies namun berbeda dengan hasil analisa secara molekuler yang memperoleh 2 spesies yaitu *Pseudopestalotiopsis coccus* strain CBS 272,29 dan *Neopestalotiopsis cubana* strain CBS 600,96.

DAFTAR PUSTAKA

- Febbiyanti, T. R. (2019). Severe outbreak of *Pestalotiopsis* leaf disease in South Sumatra. Disampaikan pada MRB-IRRDB Workshop, Melaka, Malaysia, 9th-10th April 2019.
- Febbiyanti, T. R., & Fairuza, Z. (2019). Identifikasi penyebab kejadian luar biasa penyakit gugur daun karet di Indonesia. *Jurnal Penelitian Karet*, 37(2): 193-206. DOI: 10.22302/ppk.jpk.v37i2.616
- Jeewon, R., Liew, E. C. Y., & Hydea, K. D. (2002). Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25(3):378-392. DOI: 10.1016/S1055-7903(02)00422-0.
- Karakaya, A. (2001). First report of infection of kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. in Turkey. *Plant Disease*, 85:1028.
- Keith, L. M., Maile, E. V., & Francis, T. Z. (2006). Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. *Plant Disease*, 90(1):16-23.
- Kimaru, S. K., Monda, I. E., Cheruiyot, R. C., Mbaka, & Alakonya, A. (2018). Morphological and molecular identification of the causal agent of anthracnose disease of avocado in Kenya. *International Journal of Microbiology*, (4):1-10. DOI: 10.1155/2018/4568520
- Kusdiana, A. P. J., Sinaga, M. S., & Tondok, E. T. (2020). Diagnosis penyebab penyakit gugur daun baru (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Jurnal Penelitian Karet*, 38(20): 165-178. doi: https://doi.org/10.22302/ppk.jpk.v2i38.728.
- Legiastuti, T. S., & Aminingsih, T. (2012). Identifikasi jamur endofit menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 8(2): 31-32.
- Liu, A. R., Chen, S. C., Lin, X. M., Wu, S. Y., Xu, T., Cai, F. M., & Jeewon, R. (2010). Endopytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of palmae, Rhizophoraceae, Planchonellae and Podocarpaceae in Hainan, China. *African J. of Microb. Res.*, 4(24): 2661-2669.

- Liu, F., Hou, L., & Cai, L. (2017). *Pestalotiopsis* and allied genera from *Camellia*, with description of 11 new species from China. *Sci. Rep.*, 7(1):866. Doi: 10.1038/s41598-017-00972-5.
- Maharachchikumbara, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. X., & Crous, P. W. (2014) *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79:121-186.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L. D., Liu, Z. Y., Liu, & Hyde, K. D. (2016). *Pseudopestalotiopsis ignota* and *Ps. camelliae* spp. nov. associated with grey blight disease of tea in China. *Mycology Progress*, 15(22).
- Maharachchikumbura, S. S. N., Rignon, P., Hyde K. D., Al Sadi, A. M., & Liu, Z. Y. (2016). Characterization of *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* and *Truncatella* species associated with grapevine trunk diseases in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(3): 380-390.
- Meli, C. D., & Langer, E. (2009). *Pestalotiopsis theae* (Ascomycota, Amphisphaeriaceae) on seeds of *Diospyros crassiflora* (Ebenaceae). *Mycotaxon*. 107: 441-448.
- Norphanphoun, C., Jayawardena, R. S., Chen, Y., Wen, T. C., Meepol, W., & Hyde, K. D. (2019). Morphological and phylogenetic characterization of novel *Pestalotioid* species associated with mangroves in Thailand. *Mycosphere*, 10(1): 531-578.
- Shamly, V., Kali, A., Srirangaraj, S., & Umadevi, S. (2014). Comparison of microscopic morphology of fungi using lactophenol cotton blue (lpcb), iodine glycerol and congo red formaldehyde staining. *J. Clin. Diagn. Res.*, 8 (7) . Doi : 10.7860/JCDR/2014/8521.4535
- Silva, A. C., Diogo, E., Henriques J., Ramos A. P., Sandoval-Denis, M., Crus, P. W., & Bragança, H. (2020). *Pestalotiopsis pini* sp. nov., an emerging pathogen on stone pine (*Pinus pinea* L.). *Forests*, 11(805): 1-17. Doi:10.3390/f11080805.
- Solarte, F., Munoz, C. G., Maharachchikumbura, S. S. N., & Alvarez, E. (2018). Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., causal agents of guava scab in Colombia. *Plant Disease*, 102: 49-59.
- Suwannarach, N., Sujarit, K., & Lumyong, S. (2013). First report of leaf spot disease on oil palm caused by *Pestalotiopsis theae* in Thailand. *J. of General Plant Path.* 79: 277-279.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596-1599.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis & D. H. Gelfand (Ed.). *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322).